



# هشتمین کنفرانس ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران

## اثر پودر برگ چریش بر فعالیت کمی پراکسیداز بخش هوایی گیاه گوجه- فرنگی آلوده به نماتد ریشه‌گرهی

آیت اله سعیدی زاده\*، محمد حسین فتوکیان و فهیمه نیاستی

۱- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، \* نویسنده مسئول - Email: saeidizadeh@shahed.ac.ir

۲- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد - Email: fotokian@yahoo.com

۳- کارشناس ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد - Email: fniasti95@gmail.com

### چکیده

نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne spp.*) از بیماری‌گرهای کلیدی روی انواع گیاهان زراعی، باغی و گلخانه‌ای محسوب می‌شوند. کاربرد ترکیبات شیمیایی نماتدکش موجب مهار سریع جمعیت و فعالیت این نماتدها شده است، اما این ترکیبات علاوه بر هزینه‌های سنگین، اثرات نامطلوب زیست محیطی را در پی داشته‌اند. امروزه استفاده از برخی عصاره‌های گیاهی به عنوان راهکاری مناسب جهت کنترل جمعیت نماتدهای انگل گیاهی مطرح شده است. در این تحقیق اثر پودر برگ چریش بر فعالیت کمی پراکسیداز موجود در بخش هوایی گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از نمونه‌برداری از ریشه گیاهان گوجه‌فرنگی از مزارع آلوده به نماتدهای ریشه‌گرهی، جدا سازی، شناسایی و تکثیر نماتد مورد نظر انجام گرفت. در این آزمون، میزان فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز در بخش هوایی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد و تحت تیمار چریش در شرایط گلخانه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که وجود پودر برگ چریش در خاک موجب افزایش کمی فعالیت پراکسیداز در بخش هوایی گیاهچه‌های گیاه میزبان گردید. میزان عدد جذب نوری بدست آمده در مورد پراکسیداز محلول در بخش هوایی میزبان در تیمارهای چریش ۱۰۶/۶۸، نماتد ۱۰۱/۲۴، نماتدکش ۹۳ و شاهد ۸۸/۲۴ بوده است. این مقادیر در مورد پراکسیداز دیواره سلولی میزبان در تیمارهای چریش ۱۷۸/۳۲، نماتد ۱۶۸/۸۰، نماتدکش ۱۵۵/۸۰ و شاهد ۱۴۶/۸۸ بدست آمد. پودر گیاه چریش می‌تواند با افزایش میزان پراکسیداز موجب اثر کنترلی بر فعالیت بیماری‌زایی نماتد *M. javanica* شود. بنابراین استفاده از بقایای این گیاهان جهت بهبود شرایط خاک و کاهش خسارت نماتدهای ریشه‌گرهی قابل پیشنهاد می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** مهار غیرشیمیایی، نماتدهای انگل گیاهان، عصاره گیاهی.

### ۱. مقدمه

نماتدهای ریشه‌گرهی (root-knot nematodes) متعلق به جنس *Meloidogyne* دارای بیشترین پراکنش جهانی و دامنه میزبانی در میان نماتدهای انگل گیاهان می‌باشند. گونه *M. javanica* موجب آسیب گسترده به طیف وسیعی از محصولات کشاورزی در جهان و ایران شده است (Kiriga et al., 2018). از خصوصیات مهم این نماتدها دامنه وسیع میزبانی، پراکندگی گسترده در سطح ایران و جهان و مستعد کردن گیاه برای آلودگی به سایر بیماری‌گرهای موجود در خاک می‌باشد (Hosseini Nejad and Khan, 2001). با افزایش آگاهی و دانش بشر در مورد خطرات کاربرد ترکیبات شیمیایی برای زارعین و مصرف کنندگان محصولات کشاورزی، محققین در پی یافتن سیستم‌های تلفیقی و راهکارهای جدیدی جهت جایگزینی با روش‌های شیمیایی و یا به حداقل رساندن مصرف این ترکیبات شده‌اند (Julio et al., 2017). استفاده از ترکیبات گیاهی برای کنترل برخی از نماتدهای انگل گیاهان مورد توجه محققین قرار گرفته و در مواردی مؤثر بوده است (Ntalli and Caboni, 2012; Naz et al., 2013). با توجه به افزایش رویکرد جهانی نسبت به کشاورزی ارگانیک و اهمیت سلامت محصولات کشاورزی و



# هشتمین کنفرانس ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران

خاک، جایگزینی مواد سازگار با محیط زیست به جای سموم شیمیایی صنعتی مدنظر پژوهشگران قرار گرفته است. در تحقیق حاضر مطالعه اثر نماتدکشی پودر برگ چریش (*Azadirachta indica* Jussieu)، بر فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز موجود در بخش هوایی گیاهچه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد *M. javanica* در شرایط گلخانه مدنظر می‌باشد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱-۲. مایه تلقیح نماتد *M. javanica*

جهت تهیه مایه تلقیح نماتد *M. javanica* ابتدا نمونه‌برداری از گلخانه‌های خیار واقع در منطقه ورامین انجام پذیرفت. برای آماده‌سازی مایه تلقیح نماتد *M. javanica* خالص سازی و تکثیر نماتد به روش توده تخم منفرد (single egg mass) انجام گرفت (Hussey and Barker, 1973). پتری‌های حاوی تخم در انکوباتور تاریک با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار داده شد. پس از این، سوسپانسیون نماتد به مدت یک دقیقه در محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم استریل نهایتا و تعداد لاروهای زنده شمارش گردید.

### ۲-۲. پودر گیاه مورد آزمایش

یک کیلوگرم از برگ تازه گیاه چریش از گلخانه‌های محلات تهیه شد. برگ‌ها در دمای اتاق خشک شدند. با استفاده از دستگاه آسیاب (پودر ساز) برقی (Pars Khazar, ML-320P model, Iran) برگ‌های خشک شده آسیاب و به صورت پودر همگن آماده شد. از پودر برگ گیاه مورد آزمایش برای آزمون زیست‌سنجی استفاده شد (Oka et al., 2012).

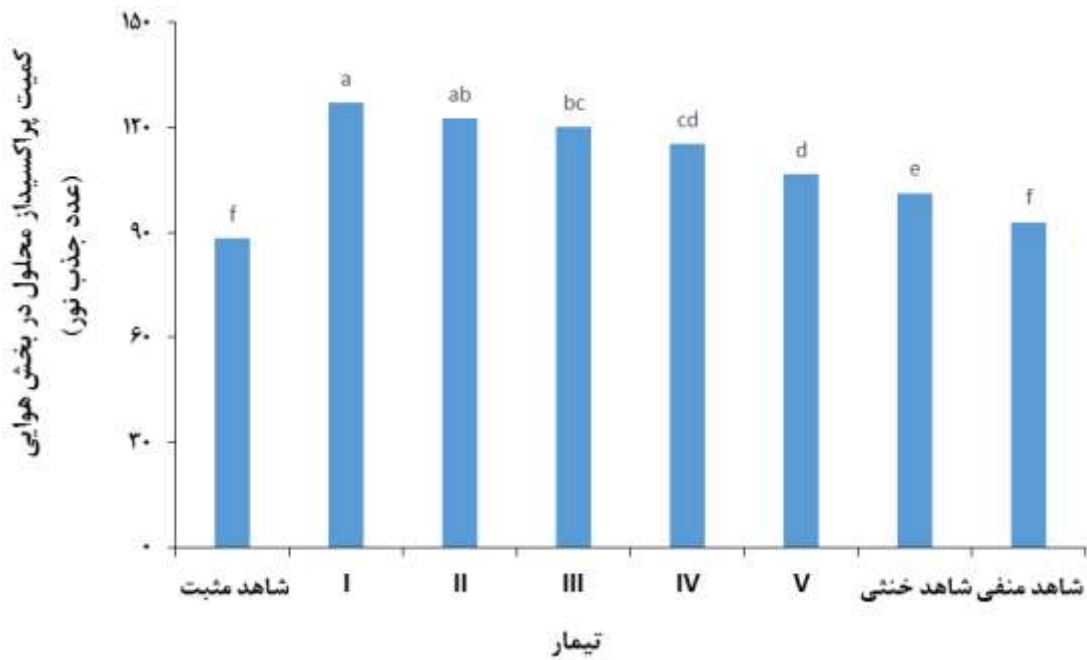
### ۳-۲. آزمون زیست‌سنجی

در این آزمون پنج غلظت از پودر برگ گیاه چریش شامل ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ گرم از پودر برگ در کیلوگرم خاک در نظر گرفته شد. برای انجام این آزمون ابتدا خاک استریل با سوسپانسیون نماتد (به میزان ۱۰ عدد لارو سن دوم در هر گرم خاک) مایه‌زنی شد. پس از اضافه کردن پودر گیاه چریش بر اساس غلظت‌های تعریف شده، انتقال خاک به گلدان‌ها (یک کیلوگرم خاک به ازای هر گلدان) انجام گرفت. سپس در هر گلدان یک گیاهچه چهاربرگی گوجه‌فرنگی رقم سوپرچیف کشت شد. اثر پودر گیاه چریش بر فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز در بخش هوایی گیاه میزبان کشت شده در خاک مایه‌زنی شده با نماتد، در زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز پس از کشت گیاهچه میزبان مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون یک شاهد مثبت (بدون پودر گیاه، نماتدکشی و نماتد)، یک شاهد منفی (دارای نماتد و نماتدکشی با دز توصیه شده) و یک شاهد خنثی (دارای نماتد و بدون پودر گیاه و نماتدکشی) در نظر گرفته شد (سعیدی‌زاده و نیاستی، ۱۳۹۰). فعالیت آنزیمی پراکسیداز محلول (SPOX: soluble peroxidase) و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی (CWPOX: cell wall peroxidase) در بخش هوایی بطور جداگانه و بر اساس روش ارایه شده توسط جاندا و همکاران (Janda et al., 2003) از طریق کاربرد گوئیکول (Guaicol, Merk, Germany)، به عنوان پیش‌ماده این آنزیم، و دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد.

## ۳. نتایج و بحث

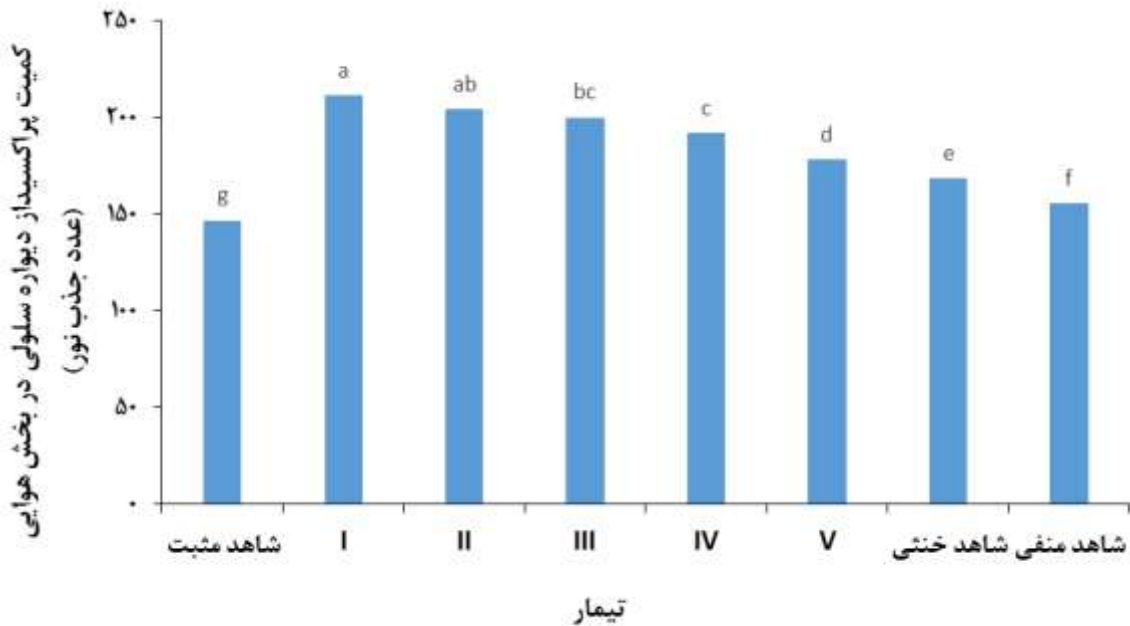
نتایج نشان داد که پودر برگ چریش موجب افزایش معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) فعالیت کمی پراکسیداز (افزایش عدد جذب نوری در دستگاه اسپکتروفوتومتر) شده است. بیشترین تا کمترین میزان فعالیت کمی پراکسیداز به ترتیب در تیمارهای مربوط به گیاه چریش غلظت پنجم (پراکسیداز محلول ۱۰۶/۶۸ و پراکسیداز دیواره سلولی ۱۷۸/۳۲)، نماتد (پراکسیداز محلول ۱۰۱/۲۴ و پراکسیداز دیواره سلولی ۱۶۸/۸۰)، نماتدکشی (پراکسیداز محلول ۹۳ و پراکسیداز دیواره سلولی) و شاهد (پراکسیداز محلول ۸۸/۲۴ و پراکسیداز دیواره سلولی ۱۴۶/۸۸) مشاهده شد (شکل ۱ و ۲). در ابتدا با افزایش زمان در معرض بودن بر میزان جذب نوری پراکسیداز افزوده شد ولی این روند به تدریج رو به کاهش نهاد به گونه‌ای که بیشترین میزان جذب نوری پراکسیداز در روز ۱۵ مشاهده شد (شکل ۳ و ۴).

# هشتمین کنگره ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران



شکل ۱. اثر تیمار غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چریش، نماتد *Meloidogyne javanica* و نماتدکش بر مقدار آنزیم پراکسیداز محلول در بخش هوایی گیاه گوجه‌فرنگی

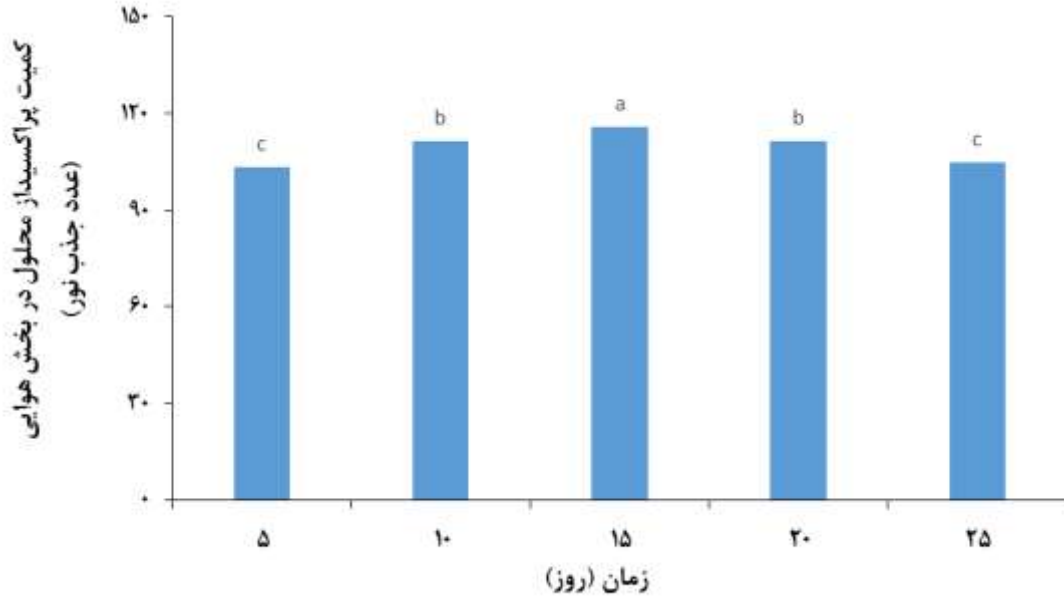
تیمارهای I, II, III, IV و V به ترتیب غلظت‌های چریش (۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ گرم بر کیلوگرم خاک بستر) بوده است.



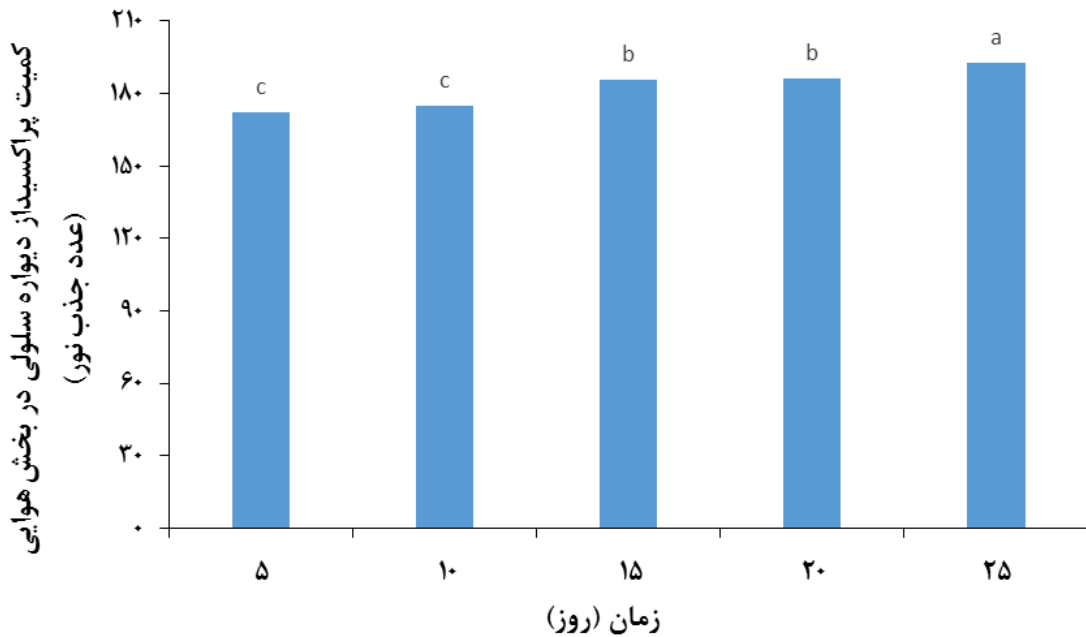
شکل ۲. اثر تیمار غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چریش، نماتد *Meloidogyne javanica* و نماتدکش بر مقدار آنزیم پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی در بخش هوایی گیاه گوجه‌فرنگی

تیمارهای I, II, III, IV و V به ترتیب غلظت‌های چریش (۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ گرم بر کیلوگرم خاک بستر) بوده است.

# هشتمین کنگره ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران



شکل ۳. اثر زمان بر مقدار آنزیم پراکسیداز محلول در بخش هوایی گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چریش، نماتد *Meloidogyne javanica* و نماتدکش



شکل ۴. اثر زمان بر مقدار آنزیم پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی در بخش هوایی گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چریش، نماتد *Meloidogyne javanica* و نماتدکش



# هشتمین کنفرانس ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران

تحقیقات متعددی نشان داده است که استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان نماتدکش در کنترل نماتدهای ریشه گرهی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مؤثر بوده است (Naz et al., 2013; Asadi Sardari et al., 2015). تحقیقات گذشته نشان داده است که گیاه چریش دارای قابلیت نماتدکشی است و محصولی به نام نیم (Neem) جهت مهار جمعیت بسیاری از نماتدهای بیمارگر ریشه گیاهان به بازار عرضه شده است (Mosumder, 1995). امروزه به منظور مطالعه واکنش دفاعی ارقام مختلف گیاهان در قبال حضور بیمارگرها و عوامل غیرزنده محیطی، از فاکتورهای بیوشیمیایی مختلفی استفاده می‌شود. برخی از آنزیم‌های موجود در گیاهان در واکنش‌های دفاعی علیه بیمارگرها نقش دارند. این آنزیم‌ها شامل آنزیم‌های اکسیدکننده مانند پراکسیداز محلول و پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی است که در تشکیل لیگنین و دیگر فنل‌های اکسیدشونده مؤثرند. ترکیبات اخیر در ایجاد سدهای دفاعی برای تقویت ساختار سلولی گیاهان نقش بسزایی دارند. فعالیت پراکسیداز در بسیاری از گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است. توزیع فراوانی و عدم پیچیدگی مطالعه، این آنزیم را به عنوان یک مارکر مولکولی مناسب در مطالعات ژنتیکی، فیزیولوژیکی و بیماری‌شناسی معرفی کرده است (Mohammadi and Kazemi, 2002). در تحقیق ما، میزان عدد جذب نوری بدست آمده در مورد پراکسیداز محلول در بخش هوایی میزبان و همچنین پراکسیداز باند شده با دیواره سلولی به ترتیب در تیمارهای چریش، نماتد، نماتدکش و شاهد، بیشترین تا کمترین مقدار بوده است. این پدیده نشان می‌دهد که وجود ترکیبات چریش در بستر رویش گیاه موجب تحریک افزایش میزان پراکسیداز در گیاه میزبان شده است. با گذشت زمان بر میزان توجه و پذیرش ترکیبات و فرآورده های گیاهی از جمله عصاره، اسانس و کود برای مهار جمعیت و فعالیت بیماری‌زایی نماتدهای انگل گیاهان بطور قابل توجهی افزوده خواهد شد، چرا که اغلب نماتدکش‌های قدیمی و سنتی به علت هزینه‌های شدید مصرف و نگرانی‌های زیست محیطی به مرور زمان کنار گذاشته خواهند شد. از نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر چنین به نظر می‌رسد که استفاده از پودر برخی گیاهان، از جمله چریش در بستر و خاک مورد استفاده جهت کشت، می‌تواند یک استراتژی مناسب و مطمئن جهت مدیریت نماتدهای ریشه گرهی باشد، این گونه مواد گیاهی می‌توانند علاوه بر مرتفع ساختن مشکلات ناشی از ترکیبات صنعتی، در کنار کاهش جمعیت فعال نماتد موجب افزایش و بهبود میزان مواد آلی خاک نیز شوند.

#### ۴. نتیجه‌گیری

پودر برگ گیاه چریش می‌تواند با افزایش میزان پراکسیداز موجود در اندام های هوایی گیاه گوجه فرنگی موجب اثر کنترلی بر فعالیت بیماری‌زایی نماتد *M. javanica* گردد. بنابراین استفاده از بقایای این گیاهان جهت بهبود شرایط خاک و کاهش خسارت نماتدهای ریشه گرهی قابل پیشنهاد می‌باشد.

#### ۵. سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه شاهد برای حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنند.

#### مراجع

۱. سعیدی‌زاده، آ. و نیاستی، ف. ۱۳۹۰. بررسی فعالیت کمی پراکسیداز ارقام زیتون در تعامل بین قارچ عامل پژمردگی ورتیسلیومی *Verticillium dahliae* و نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica*. دانش گیاهپزشکی ایران، ۴۲(۲): ۳۰۳-۳۱۳.
2. A. Asadi Sardari, A.A. Hojat Jalali, S. Bahraminejad, and D. Safae, "Effect of plant extracts on the mortality of root-knot nematodes' J<sub>2</sub>, *Meloidogyne javanica*," Arch. Phytopathol. Plant Protectec., vol. 48, No. 4, pp. 365-375, 2015.
3. S.A. Hosseini Nejad, and M.W. Khan, "Interaction of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (race 1), on chick-pea cultivars," Appl. Entomol. . Phytopathol., vol. 68, pp. 1-11, 2001.
4. R.S. Hussey, and K.R. Barker, "A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique," Plant Dis. Rep., vol. 57, pp. 1025-1028, 1973.
5. T. Janda, G. Szalai, K. Rios-Gonzales, O. Veisa, and E. Paldi, "Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals," Plant Science, vol. 164, pp. 301-306, 2003.



# هشتمین کنگره ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران

6. A.W. Kiriga, S. Haukeland, G.M. Kariuki, D.L. Coyne, N.V. Beek, "Effect of *Trichoderma* spp. and *Purpureocillium lilacinum* on *Meloidogyne javanica* in commercial pineapple production in Kenya," *Bio. Control*, vol. 119, pp. 27-32, 2018.
7. M. Mohammadi, and H. Kazemi, "Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance," *Plant Sci.*, vol. 162, pp. 401-408, 2002.
8. I. Naz, J.E. Palomares-Rius, S. Saifullah, V. Blok, M.R. Khan, and S. Ali, "In vitro and in planta nematocidal activity of *Fumaria parviflora* (Fumariaceae) against the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita*," *Plant Pathol.*, vol. 62, pp. 943-952, 2013.
9. N.G. Ntalli, and P. Caboni, "Botanical nematocides in the mediterranean basin," *Phytochem. Rev.*, vol. 11, pp. 351-359, 2012.
10. Y. Oka, B. Ben-Daniel, and Y. Cohen, "Nematicidal activity of the leaf powder and extracts of *Myrtus communis* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*," *Plant Pathol.*, vol. 61, pp. 1012-1020, 2012.